

Etude en microscopie électronique de la formation des parois des fibres du *Gossypium barbadense* L. en Egypte¹

M.G. Taha* et J. Bourély**

* Maître de Conférence au Département d'Agrochimie, Faculté d'Agronomie, Université d'EL-AZHAR, LE CAIRE, EGYPTÉ.

** Directeur du Laboratoire de Chimie des Plantes Textiles, IRCT - CIRAD, BP 5035, 34032 MONTPELLIER CEDEX 1, FRANCE.

Résumé

Nous avons examiné la formation des parois, primaire et secondaire, des fibres de la variété GIZA 75 de *Gossypium barbadense* L. en microscopie électronique à transmission et à balayage, depuis l'anthèse jusqu'à la maturité complète des fibres.

Nos résultats montrent que, comme celles de *G. hirsutum* L., les fibres de *G. barbadense* L. passent par trois étapes successives de développement : formation de la paroi primaire, mise en place et épaissement puis maturation de la paroi secondaire.

L'initiation de la paroi secondaire, essentiellement marquée

par le dépôt de couches celluloseuses successives, commence le 16^e jour après l'anthèse et alors que les fibres n'ont pas encore atteint leur longueur définitive. L'accroissement en épaisseur s'effectue en 30 jours au cours desquels 30 couches celluloseuses successives se déposent parallèlement à l'axe longitudinal des fibres.

Un modèle est proposé pour rendre compte des modifications cytoplasmiques et membranaires qui interviennent lors de la synthèse des polysaccharides et de la formation des parois des fibres des cotonniers.

MOTS CLES : *Gossypium barbadense*, parois, fibres, microscopie, cellulose.

Introduction

Presque exclusivement cultivé en Egypte et au Soudan, *Gossypium barbadense* L. fournit des fibres extra-longues et longues de finesse et de résistance exceptionnelles. L'Egypte est le sixième pays producteur mondial en ce qui concerne les quantités récoltées. Elle se situe au troisième rang mondial pour le rendement en fibres à l'hectare, au premier pour la qualité de ses fibres. Les autres pays producteurs cultivent essentiellement *Gossypium hirsutum* L., dont les fibres ne possèdent pas d'aussi bonnes caractéristiques technologiques. Il était par conséquent intéressant de se demander si ces différences de qualités avaient comme origine des modifications dans la différenciation des fibres et l'évolution de la constitution physico-chimique de leurs parois.

L'examen microscopique des fibres au cours de leur formation devrait nous permettre de mieux comprendre l'essentiel de leurs caractéristiques technologiques, longueur, tenacité, finesse et allongement.

Ce travail répond à une double préoccupation :
— apporter une meilleure connaissance de l'ontogénie des fibres textiles du *G. barbadense* en comparaison avec *G. hirsutum* ;

— mieux comprendre la formation et l'évolution des fibres au cours de leur maturation, en vue de satisfaire aux exigences de la production cotonnière, à savoir : augmenter le rendement en fibres de meilleures qualités.

La plupart des qualités technologiques des fibres du cotonnier dépendent de la longueur, de l'épaisseur et de la constitution physico-chimique de leurs parois. Il importe donc de savoir comment elles se forment et quelle est leur composition. Les fibres se développent dans un laps de temps bien défini avec des étapes successives de croissance. Encadrée par la floraison et l'ouverture de la capsule, l'évolution des fibres commence par une croissance apicale et sub-apicale intense qui en multiplie la longueur initiale par 2.000 à 3.000 (RYSER, 1977). Il est couramment admis que la fibre est unicellulaire et qu'elle se développe à partir d'une cellule de l'épiderme de l'ovule. Ce fait a été établi par BALLS (1915 et 1928) sur cotonnier égyptien, ANDERSON et KERR (1938) et SCHUBERT *et al.* (1973) sur cotonnier américain.

Les parois des fibres mûres sont constituées essentiellement de microfibrilles qui renferment plus de 95 % de cellulose. Le processus par lequel les parois se forment et

(1) Ce travail constitue la cinquième partie de la Thèse de Doctorat d'Etat soutenue le 19 décembre 1986, à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, par M.G. TAHA et préparée au Laboratoire de Chimie des Plantes Textiles de l'IRCT, à Montpellier.

les microfibrilles s'organisent dans les parois fibreuses est peu connu. Aussi, nous sommes nous proposés d'examiner les transformations cellulaires qui conduisent à la

synthèse des parois, primaire et secondaire, des fibres du *Gossypium barbadense* L., dans les conditions particulières de leur développement en Egypte.

Matériel et techniques

Microscopie électronique à transmission

La variété égyptienne de *Gossypium barbadense* L. GIZA 75 a été cultivée en Bahim, en Egypte, sur la station expérimentale du Cotton Research Institute.

Les fleurs sont étiquetées le jour de l'anthèse. Les capsules sont récoltées à différents stades de développement, à partir du 8^e jour après l'anthèse et jusqu'à la maturité complète des fibres (60 jours après l'anthèse). Les fibres et jeunes graines (coton-graine) de chaque capsule sont séparées à l'aide d'un scalpel et d'une pince et conservées immédiatement dans l'alcool éthylique à 95 %. Des fragments de fibres de quelques millimètres de longueur sont fixés par une solution de glutaraldéhyde à 4 %, tamponnée à pH 7,5 par une solution de cacodylate de sodium 0,1 M.

Après deux heures de fixation à la température du laboratoire, puis trois rinçages d'une heure dans le même tampon, les échantillons sont post-fixés pendant une heure par une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 % dans l'eau (pH 7,4).

Plusieurs lavages à l'eau distillée sont pratiqués, puis les pièces sont déshydratées par passages successifs dans des solutions d'éthanol de concentration croissante, 25° - 50° - 70° - 85° - 95° G.L., puis par trois bains successifs d'une heure dans l'alcool absolu.

Après un séjour d'une demi-heure dans un mélange à volume égal d'alcool éthylique absolu et d'oxyde de propylène, les échantillons sont plongés dans trois bains successifs d'oxyde de propylène pur pendant une demi-heure. Les pièces sont ensuite incluses dans la résine (SPURR, 1969). Les coupes ultra-fines, effectuées à l'ultramicrotome OMU3 de REICHERT avec un couteau en diamant DIATOME, sont recueillies sur des grilles en or.

Pour la mise en évidence des polysaccharides membranaires, la méthode de THIERY (1967) au thiocarbohydrazide - protéinate d'argent est utilisée. Les coupes sont examinées à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL - JEM 200.

Microscopie électronique à balayage

Les échantillons sont fixés, post-fixés et déshydratés par des solutions d'éthanol de concentration croissante, comme nous venons de le décrire. Au cours du traitement par l'éthanol absolu, une partie des échantillons est traitée selon la technique du point critique dans du CO₂ liquide. Le matériel subit ensuite une métallisation sous vide avec de l'or pur. Les coupes sont examinées avec un microscope électronique à balayage.

Traitement des clichés à l'analyseur d'image

Les micrographies obtenues au cours de l'examen microscopique sont directement observées à l'aide d'une caméra CCD FAIRCHILD reliée au système d'analyse composé d'une unité centrale (DATA SUD system) et de périphériques (fig. 1). Une carte d'acquisition permet l'enregistrement des images obtenues par la caméra. Elle est reliée à trois plans mémoire pour le stockage et l'analyse d'image.

Une carte CPU (Card Programming Unity) et une carte mémoire de 256 Kilo-octets gèrent le système. D'autre part, une carte couleur permet de colorer les niveaux de gris, ce qui augmente les possibilités d'analyse. On observe l'image directe ou acquise sur un écran noir et blanc et l'image colorée après acquisition sur un écran couleur. Un terminal muni d'un clavier et d'un moniteur permet d'entrer les programmes et d'examiner les résultats qui peuvent être enregistrés sur une imprimante.

L'analyse d'image consiste alors à des reconnaissances de formes ou d'objets dont il faut soit compter le nombre, soit caractériser divers paramètres (surface, périmètre, diamètre, centre de gravité, facteur de forme).

L'un des intérêts de l'analyseur d'image est de pouvoir attribuer à chaque niveau de gris une couleur différente à partir d'une palette obtenue en mélangeant les trois couleurs fondamentales bleu, jaune, rouge ; chaque couleur pouvant prendre un des 256 niveaux de gris. Ainsi, les 256 niveaux de gris peuvent chacun être reconnus par une couleur différente. Cela permet de différencier les objets à étudier de ceux qui les entourent. Le traitement des micrographies à l'analyseur d'image donne de bons contrastes au niveau des organites chargés de sels d'argent, après application de la méthode de THIERY.

Résultats

Modifications cytoplasmiques et membranaires des fibres au cours de la formation de la paroi primaire

Les fibres sont des cellules de l'épiderme de l'ovule qui se mettent en place le jour même de l'anthèse. Une fibre âgée de 8 jours après l'anthèse possède une paroi primaire de 0,13 µm d'épaisseur (fig. 2, pp).

Les nombreux dictyosomes, d, à proximité de la paroi primaire, pp, sont constitués par un empilement de 5 à 7 saccules, s, aplatis renflés sur leurs bords, au niveau desquels de petites vésicules, vg, sont émises dans le cytoplasme.

Trois types de vésicules sont observés. De petites

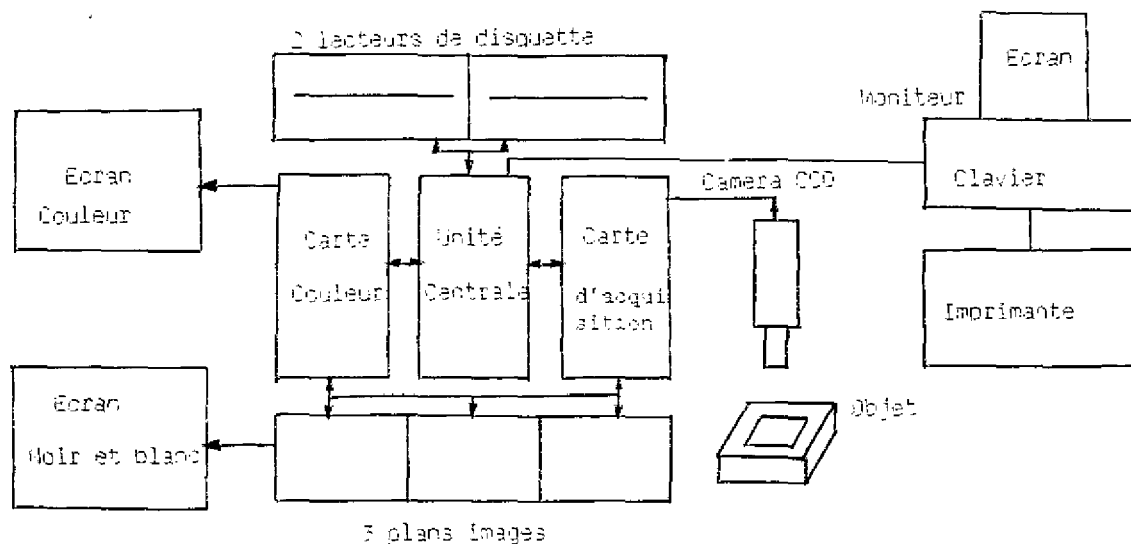


Figure 1
Schéma de l'analyseur d'images.
Diagram of image analyser.

vésicules (vg et flèches) associées au plasmalemme, ou au contact de la paroi primaire, pp, ont un contenu dense. Les vésicules plus volumineuses, de 100 à 600 Å de diamètre (vg et flèches doubles), semblent provenir de la coalescence d'éléments de plus faibles dimensions. Elles sont marquées surtout à leur périphérie. Un troisième type de vésicules, ve, issues des saccules dictyosomaux (d et flèche blanche) sont des vésicules de transport, issues de la zone de transition du réticulum endoplasmique, rer. Elles sont remplies de réserves de sécrétion de même nature que celles qui participent à la synthèse de la paroi primaire, pp.

Le réticulum «smooth» (res) est spécialement développé près de la paroi primaire.

Une coupe transversale ultra-fine d'une fibre âgée de 12 jours après l'anthèse montre la présence de polysaccharides dans les vésicules formées par les saccules dictyosomaux (fig. 3, vg et flèches). Ces substances sont similaires à celles rencontrées dans la paroi primaire (fig. 3, pp et flèches).

L'épaisseur de la paroi primaire augmente jusqu'à 0,22 µm. Le réticulum endoplasmique «rough» forme un système de cavités intracytoplasmiques qui portent des ribosomes à leur face extérieure (fig. 3, rer). La forme «smooth» se présente à côté du plasmalemme (res, pl, et flèches fines). On note la présence de vésicules, les unes (vg et flèches) associées aux dictyosomes, les autres au plasmalemme (vg, pl et flèches doubles). Toutes ces vésicules sont fortement marquées après application de la méthode de THIERY.

On note la similitude d'aspect entre d'une part le contenu des dictyosomes, d, des vésicules golgiennes, vg, et le plasmalemme, pl, et d'autre part, les substances qui constituent la paroi primaire (fig. 3, pp et flèches épaisses). Tous ces organites, chargés de polysaccharides, contribuent à la synthèse de la paroi primaire.

Le noyau (fig. 4, N) possède des zones de chromatine condensée, chr, dans lesquelles se concentre l'ADN.

Sur la droite de la figure 4, on remarque un corps multivésiculaire, cmv, dont la membrane externe est dissociée (cmv et flèches doubles). À l'intérieur du corps multivésiculaire, de petites vésicules, ve, sont fortement marquées par la méthode de THIERY. De grandes vésicules (ve et flèches blanches) sont marquées à leur périphérie. On remarque aussi une mitochondrie (fig. 4, m). Un dictyosome, d, émet de nombreuses vésicules, vg, chargées de polysaccharides. Le plasmalemme devient localement discontinu et s'échancre en des profils sinueux (fig. 4, pl et flèches fines).

L'examen à un fort grandissement d'une fibre âgée de 12 jours après l'anthèse montre des microtubules, largement distribués parallèlement à l'axe longitudinal de la cellule (fig. 5, mti).

La figure 6 présente, en coupe transversale, une fibre âgée de 12 jours. Des vésicules (vg et flèches fines) chargées de polysaccharides sont libres dans le cytoplasme ou associées au plasmalemme (pl et flèches épaisses). Certaines sont au contact de la paroi primaire et s'y intègrent (pp et doubles flèches). La similitude du contenu des vésicules et leur étroite association avec la paroi montrent qu'elles participent activement à l'édification de la paroi primaire, pp.

Événements liés à la mise en place et à l'épaississement de la paroi secondaire

La mise en place de la paroi secondaire, essentiellement marquée par des dépôts de couches cellulosiques successives, commence après la synthèse de la paroi primaire et avant que la fibre ait atteint sa longueur définitive.

La figure 7 présente le début de la mise en place de la paroi secondaire (ps et flèches fines) d'une fibre âgée de 16 jours après l'anthèse. La paroi secondaire, ps, se constitue en un réseau extrêmement lâche de fines fibrilles celluloses (fi et flèches fines) au contact de la paroi primaire, pp.

On observe des mitochondries, m, et de nombreuses vésicules, vg, chargées de polysaccharides. Des microvésicules (mv et flèches épaisses) s'incorporent au plasmalemm, pl. L'application de la méthode de THIERY après un traitement de 5 heures par l'acide périodique sur une coupe transversale d'une fibre âgée de 20 jours après l'anthèse montre que les dépôts fibrillaires sont régulièrement espacés parallèlement à l'axe longitudinal de la fibre (fig. 8, fi). A ce stade, le nombre de couches celluloses, fi, varie de 4 à 5, représentant les jours de croissance en épaisseur. Chaque couche est formée d'une centaine de fibrilles de 0,4 µm d'épaisseur.

On note une activité dictyosomale intense avec la formation de nombreuses petites vésicules au contenu dense, vg, et d'autres contrastées seulement à leur périphérie (ve et flèches épaisses). Les saccules de l'appareil de Golgi forment des dilatations (flèches blanches) qui donnent naissance à un autre type de vésicules, vs, fortement chargées de sels d'argent. Des microvésicules, mv et flèches fines, au contenu polysaccharidique s'intègrent au plasmalemm, pl.

On observe une mitochondrie (fig. 8, m), des ribosomes, r, associés par groupes de 4 à 10 en polysomes spiralés (flèches doubles), à proximité du réticulum endoplasmique, rer.

La paroi secondaire poursuit son épaissement par des dépôts celluloses successifs. Une coupe transversale d'une fibre âgée de 24 jours après l'anthèse, traitée par l'acide périodique pendant 5 heures puis par la méthode THIERY, montre que la paroi secondaire, ps, est constituée de 8 couches celluloses concentriques (fig. 9, fi) correspondant au nombre de jours écoulés depuis la mise en place de la paroi secondaire.

Le réticulum endoplasmique (fig. 9, rer) donne naissance à des microvésicules, mv, associées au plasmalemm (pl et flèches) et fortement chargées de polysaccharides.

Les vésicules situées à proximité des dictyosomes sont de trois types : les unes, ve, libres dans le cytoplasme ; d'autres, de grandes dimensions (vg et flèches épaisses) sont seulement marquées à leur périphérie. Les dernières associées au plasmalemm ont un contenu dense, opaque aux électrons (fig. 9, pl et vg).

Une coupe transversale d'une fibre âgée de 28 jours après l'anthèse (fig. 10) montre que la paroi secondaire, ps, est constituée de 11 à 12 couches celluloses, fi. A ce stade, le réticulum endoplasmique, rer, fournit de nombreuses microvésicules au contact immédiat du plasmalemm (fig. 9 et 10, mv et flèches) auquel elles s'incorporent.

Les dictyosomes, d, émettent toujours de nombreuses vésicules, vg, de toutes dimensions, fortement chargées de polysaccharides.

Enfin d'autres vésicules, semblant avoir traversé le plasmalemm (flèches blanches), se situent au contact immédiat de la dernière couche en voie de formation de la paroi secondaire.

Le plasmalemm d'une fibre âgée de 28 jours après l'anthèse (fig. 11, pl) présente un contour très sinueux. Des invaginations, i, de 300 à 500 Å de diamètre, s'incorporent au plasmalemm par un phénomène d'endocytose. Ces invaginations assurent à leur tour la formation de diverses vésicules (fig. 11 et 12, vi) fortement marquées après application de la méthode de THIERY. Ces observations montrent que ces organites interviennent dans la synthèse de la cellulose de la paroi secondaire (BROWN et MONTEZINOS, 1976).

La figure 13 présente une coupe transversale d'une fibre âgée de 40 jours après l'anthèse, après application de la méthode de THIERY et examen à l'analyseur d'image. La paroi secondaire, ps, constituée par l'alternance de 24 couches concentriques de fibrilles celluloses, fi, poursuit son épaissement. A proximité du plasmalemm, pl, un réseau de fines fibrilles (fi et flèches fines) indique la mise en place de la dernière couche cellulose de la paroi secondaire. Des microvésicules, mg et mv, fortement chargées de sels d'argent sont accolées au plasmalemm. On en trouve aussi au niveau des fibrilles.

Au contact immédiat du plasmalemm, pl, des vésicules, vg, et un corps multivésiculaire, cmv, sont chargés de polysaccharides. Un dictyosome, d, produit de petites vésicules (flèches doubles) et d'autres, plus volumineuses, marquées à leur périphérie (vg et flèche épaisse).

Dans une fibre âgée de 60 jours (fig. 14), les couches celluloses qui constituent la paroi secondaire, ps, sont dès lors plus épaisses. On observe de fréquentes anastomoses entre deux anneaux consécutifs (fi et flèches épaisses). A ce stade, on note la présence de 30 couches celluloses représentant le nombre de jours de croissance en épaisseur de la paroi secondaire. A proximité du plasmalemm, pl, une dilatation d'un saccule dictyosomal (fig. 14 et flèche blanche) forme des vésicules sécrétrices, vs, qui s'intègrent au plasmalemm.

Examen microscopique de fibres d'âges différents

Examinons au microscope électronique à balayage des fibres à différents stades de différenciation. Huit jours après l'anthèse (fig. 15), la jeune fibre a l'aspect d'un long tube aplati ; elle présente un vrillage à torsion alternée, droite ou gauche, avec renversement fréquent du sens de rotation (flèches). A ce stade, la fibre est exclusivement formée d'une fine paroi primaire pectocellulose recouverte extérieurement d'une mince pellicule cireuse (KASSENBECK, 1961 ; ROLLINS, 1968). Le sens du vrillage suit exactement l'orientation longitudinale spirale des microfibrilles de la paroi primaire (fig. 15, flèches).



Figure 2
Coupe transversale d'une fibre âgée de
8 jours après l'anthèse.
Cross-section of a fibre 8 days after
anthesis.

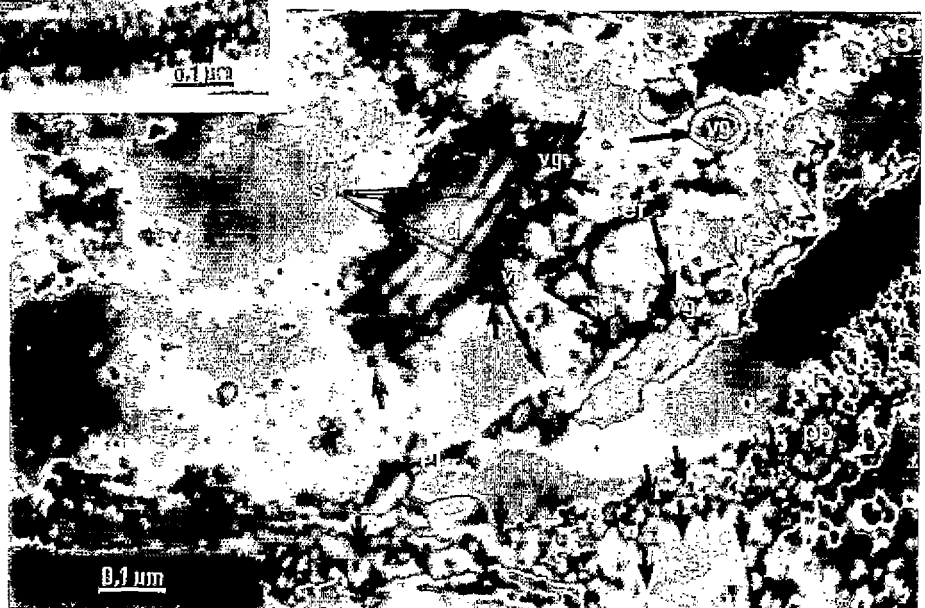


Figure 3
Coupe transversale d'une fibre âgée de
12 jours après l'anthèse.
Cross-section of a fibre 12 days after
anthesis.

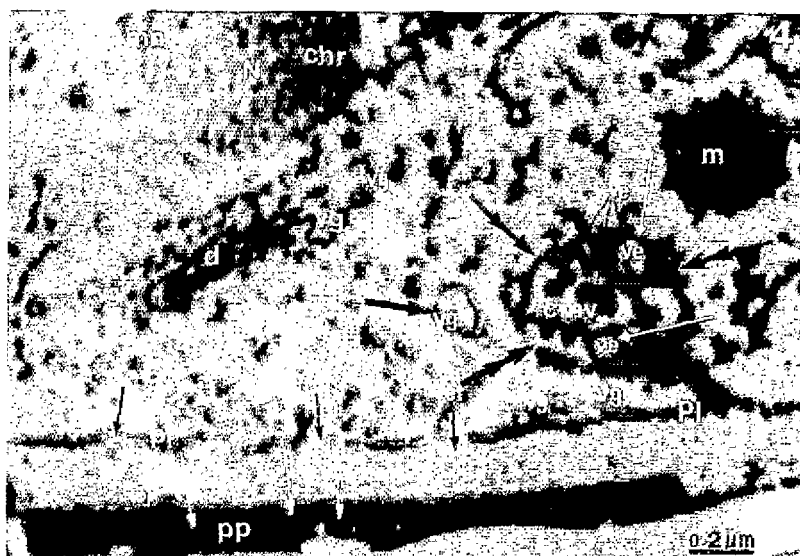


Figure 4
Coupe transversale effectuée au cours
de la synthèse de la paroi primaire
(fibre âgée de 12 jours après l'anthèse).
Cross-section during synthesis of
primary wall (fibre 12 days after
anthesis).

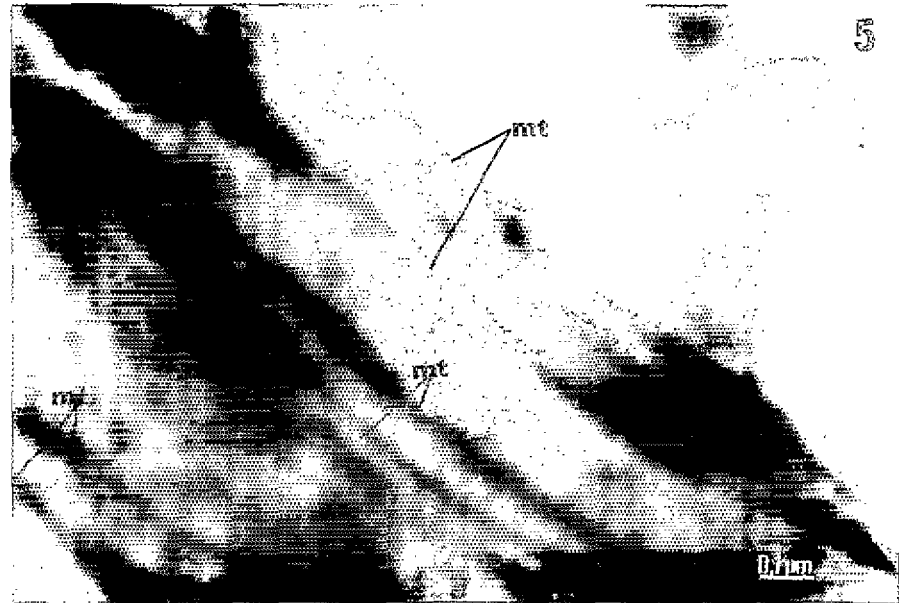


Figure 5
Microtubules, mt, pendant
la formation de la paroi primaire.
*Microtubules (mt) during formation of
primary wall.*

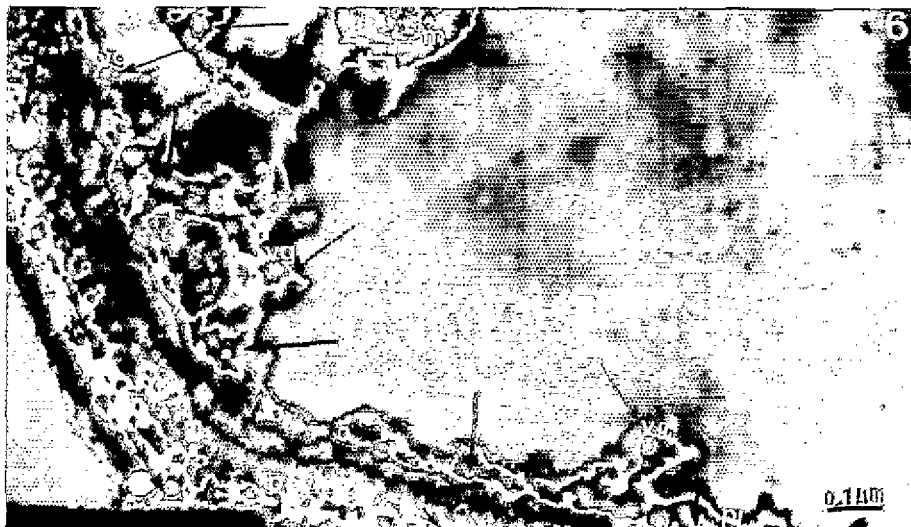


Figure 6
Coupe transversale d'une fibre âgée de
12 jours après l'anthèse, montrant le
rôle des vésicules dans la synthèse de
la paroi primaire.
*Cross-section of a fibre 12 days after
anthesis showing the role of vesicles in
primary wall synthesis.*

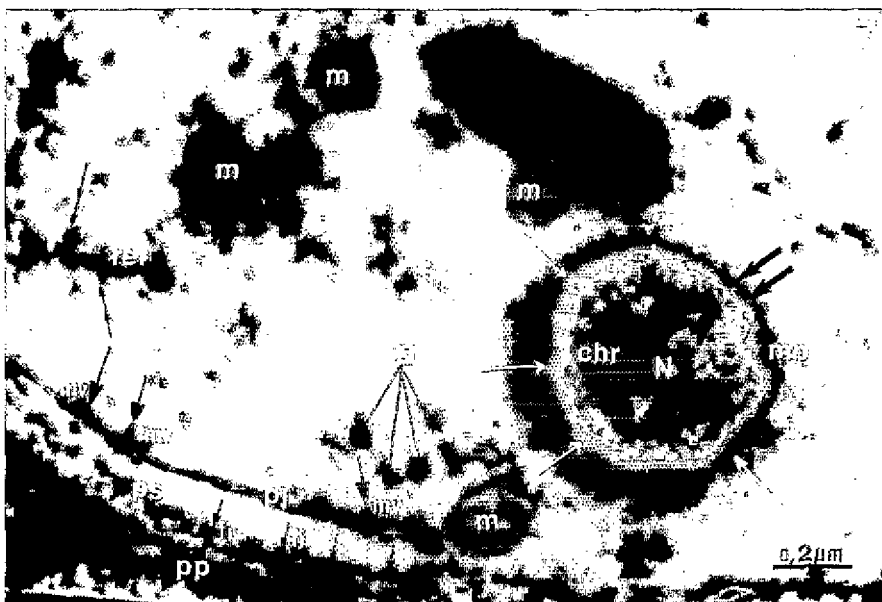


Figure 7
Début de la mise en place de la paroi
secondaire, ps, d'une fibre âgée de
16 jours après l'anthèse.
*Start of formation of secondary wall
(ps) in a fibre 16 days after anthesis.*



Figure 8
Coupe transversale d'une fibre âgée de 20 jours après l'anthèse.
Cross-section of a fibre 20 days after anthesis.

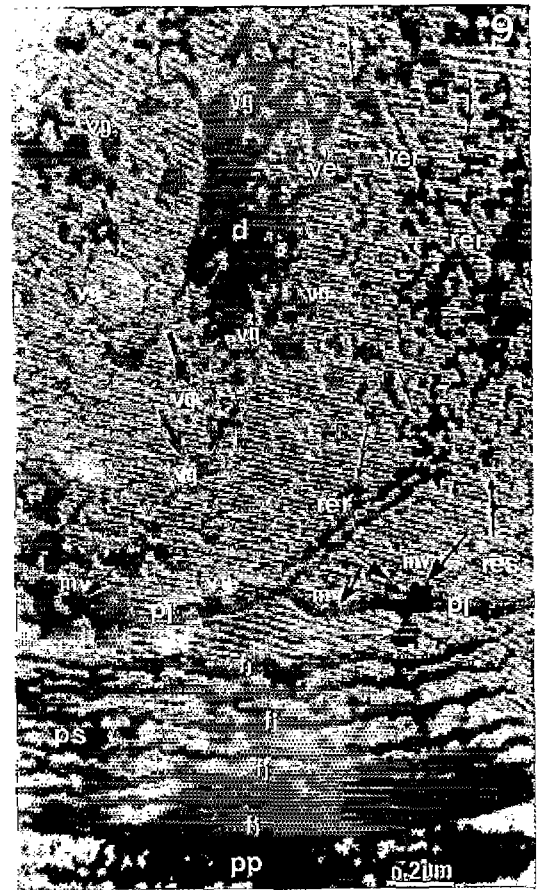


Figure 9
Coupe transversale d'une fibre âgée de 24 jours après l'anthèse. Huit couches cellulodiques, fi, peuvent être dénombrées dans la paroi secondaire, ps.
Cross-section of a fibre 24 days after anthesis. Eight cellulose layers (fi) can be counted in the secondary wall (ps).

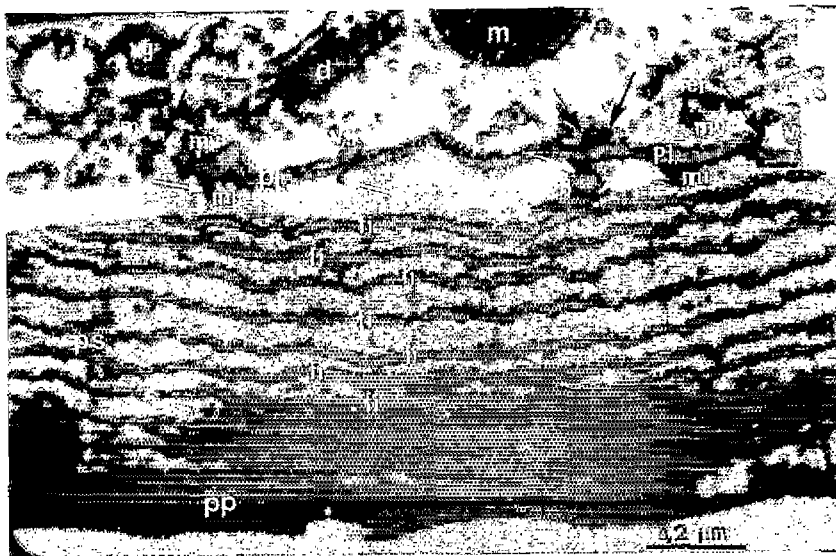


Figure 10
Coupe transversale d'une fibre âgée de 28 jours après l'anthèse. La paroi secondaire, ps, est constituée de 11 à 12 couches cellulodiques, fi, disposées parallèlement à l'axe longitudinal de la cellule.
Cross-section of a fibre 28 days after anthesis. The secondary wall (ps) consists of 11 to 12 cellulose layers (fi) arranged parallel to the longitudinal axis of the cell.

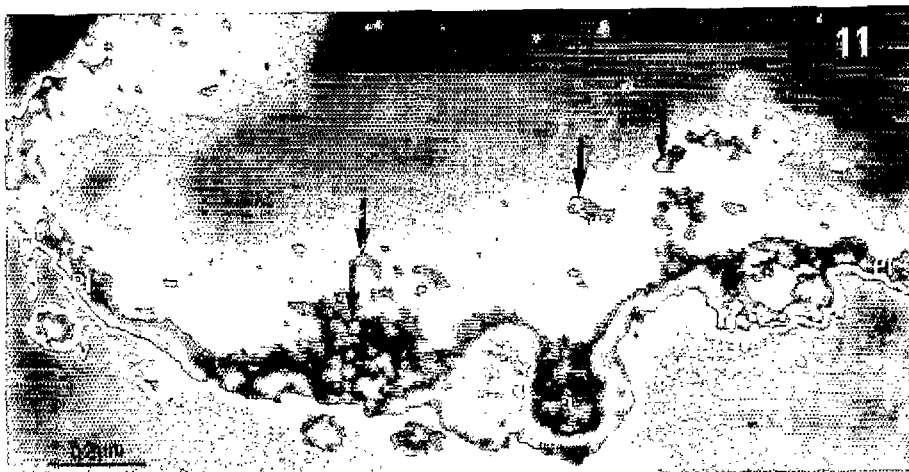


Figure 11
Détail du plasmalemm, pl, d'une fibre âgée de 28 jours après l'anthèse.
Detail of plasmalemma (pl) in a fibre 28 days after anthesis.



Figure 12
Détail du plasmalemma, pl, d'une fibre
âgée de 28 jours après l'anthèse.
*Detail of plasmalemma (pl) in a fibre
28 days after anthesis.*

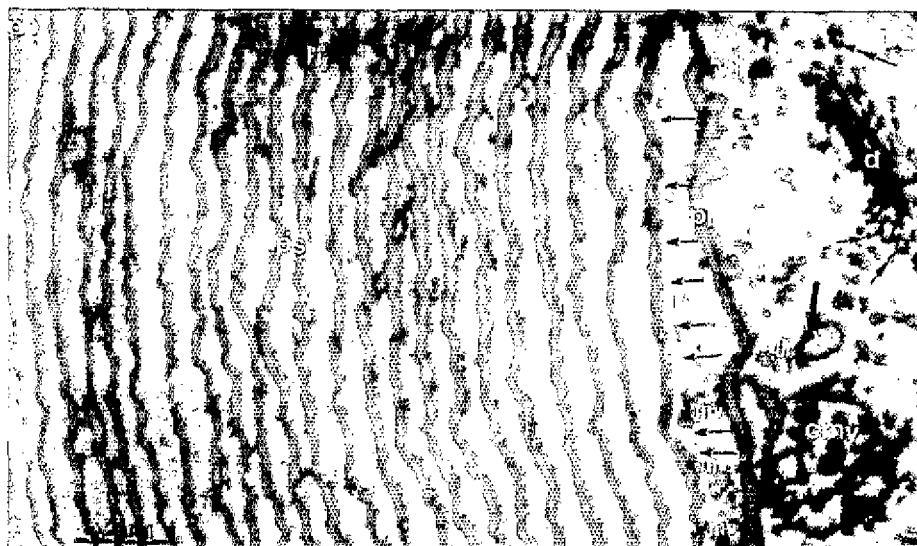


Figure 13
Coupe transversale d'une fibre âgée de
40 jours après l'anthèse. La paroi
secondaire, ps, se compose de
24 couches cellulodiques.
*Cross-section of a fibre 40 days after
anthesis. The secondary wall (ps) is
made up of 24 cellulose layers.*

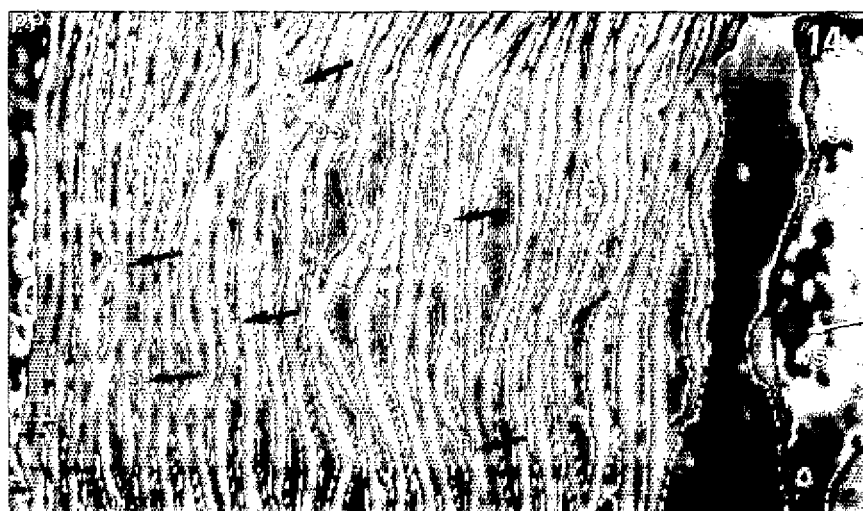


Figure 14
Coupe transversale d'une fibre âgée de
60 jours après l'anthèse. On observe
30 couches fibrillaires disposées
parallèlement à l'axe longitudinal
de la fibre.
*Cross-section of a fibre 60 days after
anthesis. 30 fibril layers are arranged
parallel to the longitudinal axis of
the fibre.*

16 jours après l'anthèse (fig. 16), la paroi secondaire commence à se développer. Les couches cellulodiques successives épaississent et consolident la paroi, aussi les fibres aplaties sous forme de rubans vrillés sont elles moins nombreuses que précédemment. Les fibrilles cellulodiques dessinent un réseau hélicoïdal (fig. 15 et 16, flèches fines).

La figure 17 présente des fibres âgées de 40 jours après l'anthèse. L'aspect cylindrique n'est pas encore définitivement acquis. On note par endroits (flèches blanches) le

dédoubllement de certaines cellules en sous-unités élémentaires. Les fibrilles cellulodiques sont orientées parallèlement à l'axe longitudinal (flèches doubles).

60 jours après l'anthèse (fig. 18), les fibres ont atteint leur complète maturité. On n'observe dès lors aucun aplatissement cellulaire. Toutes les fibres ont une forme cylindrique régulière, à cause de l'épaississement considérable de la paroi secondaire cellulodique qui occupe l'essentiel du volume cellulaire.

Discussion

Modèle proposé pour expliquer les modifications cytoplasmiques et membranaires liées à la formation des parois des fibres

Nos observations en microscopie électronique ont montré que chez *Gossypium barbadense* L. le développement de la fibre passe par trois étapes successives : formation de la paroi primaire, mise en place de la paroi secondaire, puis épaississement cellulodique et maturation.

À l'appui des données bibliographiques, nous proposons un modèle pour rendre compte des modifications ultrastructurales cytoplasmiques et membranaires qui interviennent lors de la synthèse des polysaccharides et de la formation des parois, primaire et secondaire, des fibres de *Gossypium barbadense* L.

La figure 19 résume nos observations.

1) Au moment de la synthèse de la paroi primaire, des synthétases se forment dans le réticulum endoplasmique, rer et res (SRIVASTAVA et O'BRIEN, 1966; ROLAND, 1967).

2) Ces enzymes passent du réticulum jusqu'à l'appareil de Golgi, aG, suivant trois modalités différentes :

- par l'intermédiaire de petites vésicules de transport, ve, qui se forment à partir de la zone de transition du réticulum endoplasmique ;
- par de fines contractions des membranes réticulaires, provoquant l'augmentation de la pression interne, d'où l'écoulement de son contenu à l'extérieur du réticulum (flèches) ;
- par l'écoulement même du contenu du réticulum, localement dissocié (BENNETT, 1956).

Des précurseurs membranaires sont synthétisés dans les saccules dictyosomaux sous l'action des enzymes issues du réticulum.

3) Les saccules dictyosomaux forment des dilatactions (3, flèches opposées) qui incorporent ces réserves (FRANKE, 1970).

4) Les dilatactions se déplacent vers la périphérie des saccules et donnent naissance à des vésicules sécrétrices, vs, (voir aussi fig. 2, 8, vs et flèches blanches).

5) Les vésicules sécrétrices, vs, se détachent des saccules vers le plasmalemme, pl.

6) Les vésicules sécrétrices ont de fréquents contacts avec le plasmalemme, pl, où s'effectuent des phénomènes d'endocytose (vs et flèches doubles). Leur contenu polysaccharidique se déverse au niveau de la paroi primaire (tirets et pp).

7) Les dictyosomes émettent des vésicules golgiennes. Les unes volumineuses (vg et flèches doubles) sont seulement contrastées à leur périphérie ; les autres (vg et flèches), fortement chargées de polysaccharides, déversent leur contenu au niveau de la paroi primaire (vg, tirets, flèches et pp). Elles contribuent ainsi à l'épaississement de la paroi pendant la phase d'allongement des fibres (BROWN et MONTEZINOS, 1976).

8) Au début de la synthèse de la paroi secondaire, ps, les membranes dissociées des vésicules sécrétrices, vs, et golgiennes, vg, libèrent les enzymes responsables de la polymérisation des polysaccharides et de la formation des microfibrilles cellulodiques, fi. Ces membranes s'associent au plasmalemme au niveau duquel une cellulose synthétase en bêta 1,4 se constitue de place en place, ainsi que des précurseurs membranaires polysaccharidiques dont l'uridine diphosphate glucose et l'UDP galactose (ROLAND et PILET, 1974; RYSER, 1985).

Ces éléments contribuent à la synthèse des microfibrilles cellulodiques, fi, de la paroi secondaire.

9) Au cours de l'épaississement de la paroi secondaire, on observe fréquemment le réticulum endoplasmique, rer, au contact du plasmalemme, pl. De place en place, la membrane réticulaire externe est lisse, par suite de la libération des ribosomes qui s'associent en polysomes spirales dans le cytoplasme (flèches fines). Les parties lisses de la membrane réticulaire se dilatent vers l'extérieur (flèches épaisses) pour former des microvésicules (mv et flèches doubles) qui se détachent du réticulum et entrent au contact du plasmalemme (voir aussi fig. 9 et 10).

Des micro-invaginations, mi, forment à leur tour à partir du plasmalemme, pl, diverses microvésicules, mv, qui transportent la cellulose synthétase nécessaire à la formation des couches cellulodiques de la paroi secondaire (fi et ps).

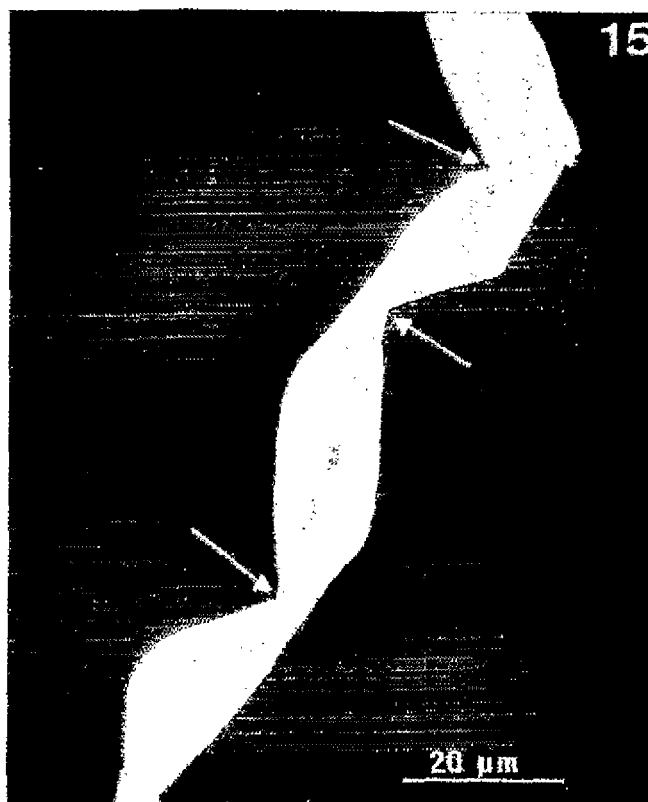


Figure 15
Examen, en microscopie électronique à balayage, d'une fibre
âgée de 8 jours après l'anthèse.
Scanning electron microscopy of a fibre 8 days after anthesis.



Figure 16
Examen, au microscope électronique à balayage de fibres
âgées de 16 jours après l'anthèse, au début de la formation de
la paroi secondaire.
*Scanning electron microscopy of fibres 16 days after anthesis at
the start of secondary wall formation.*

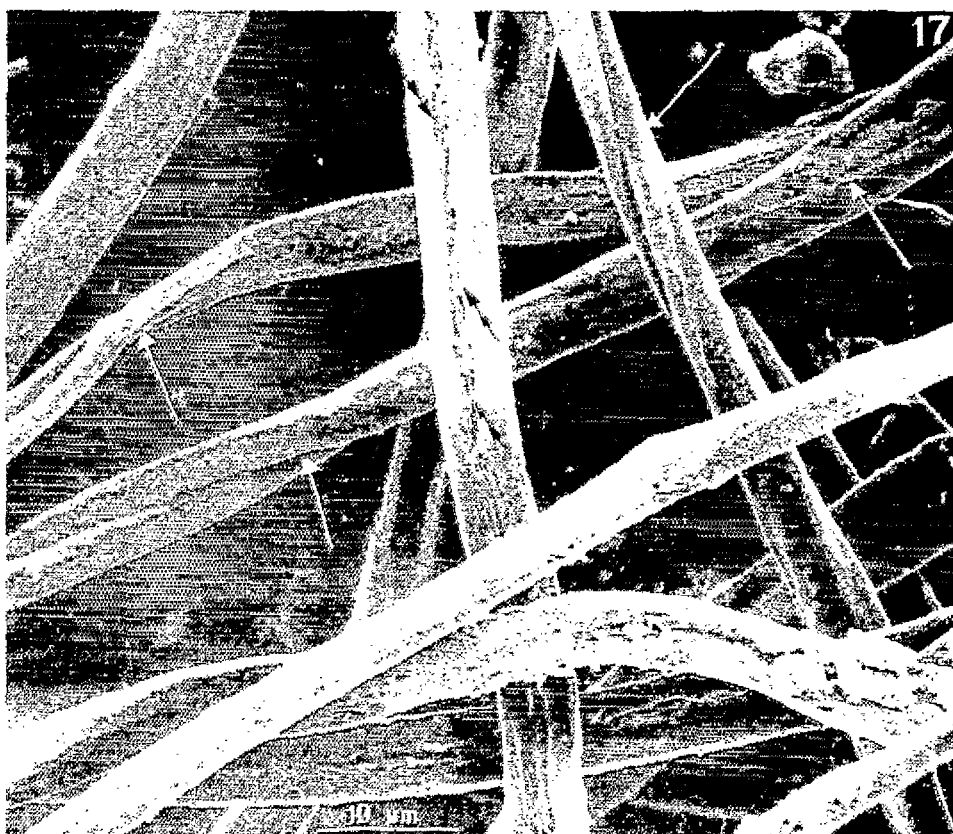


Figure 17
Examen au microscope électronique à balayage de fibres âgées de 40 jours après l'anthèse.

Scanning electron microscopy of fibres 40 days after anthesis.

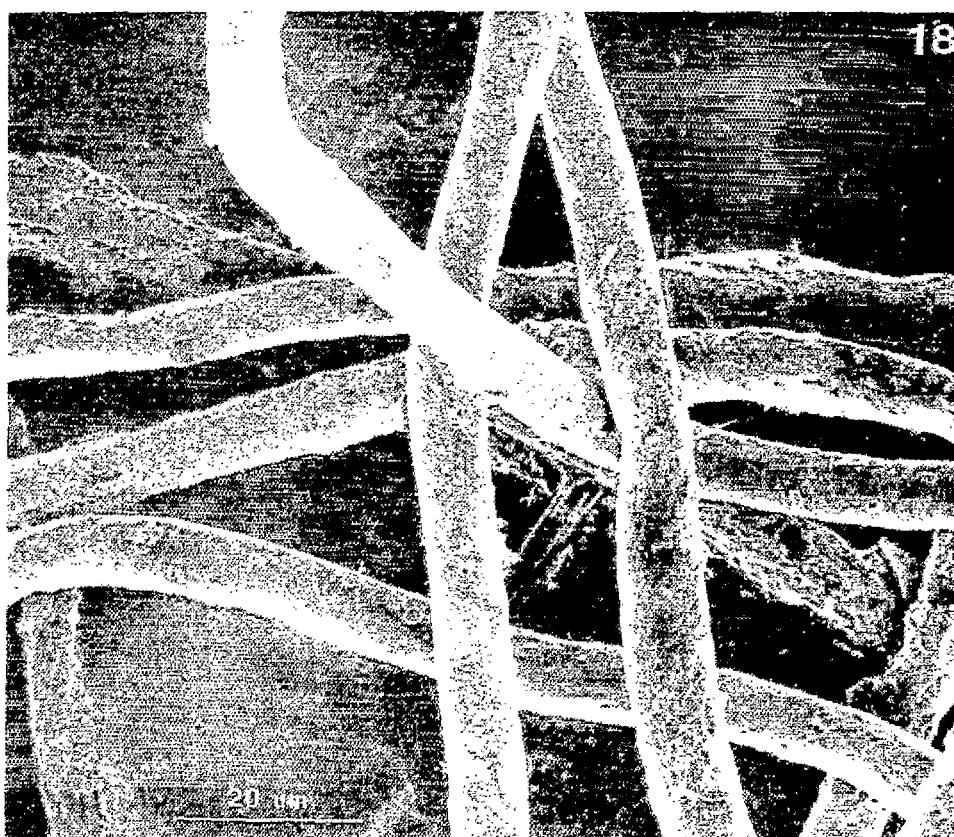
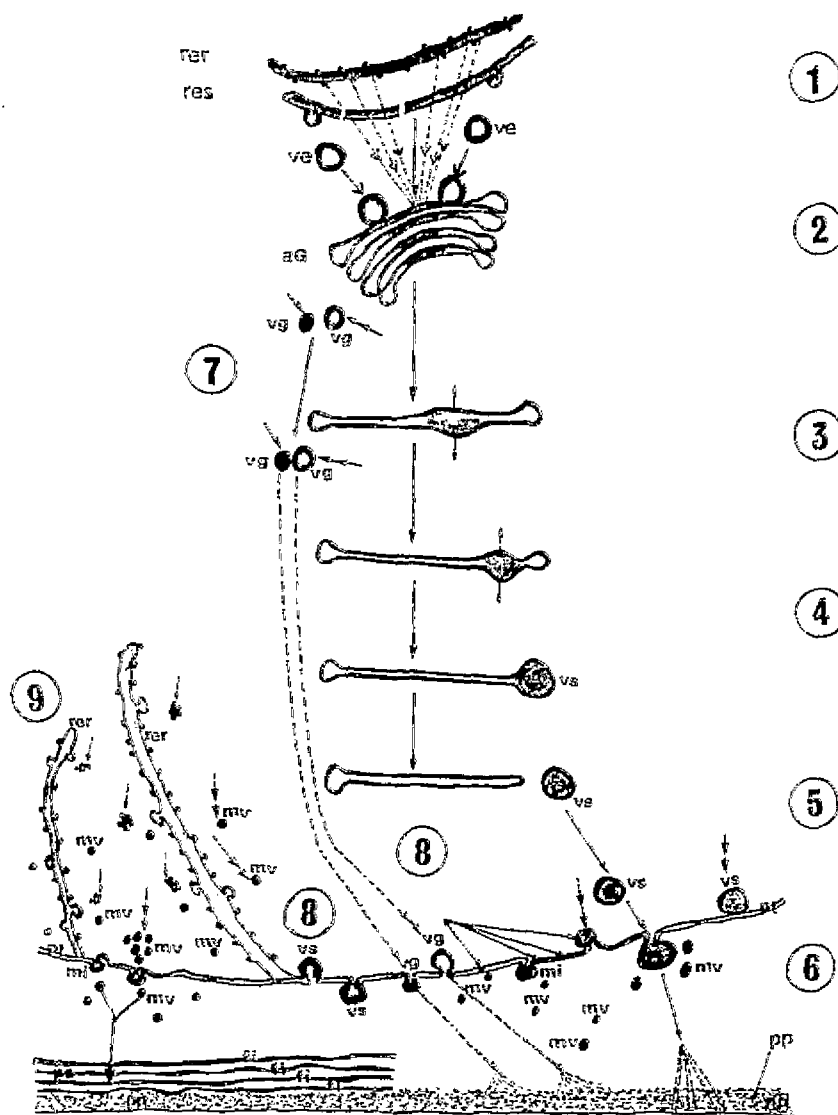


Figure 18
Examen au microscope électronique à balayage de fibres âgées de 60 jours après l'anthèse.

Scanning electron microscopy of fibres 60 days after anthesis.



Les hémicelluloses, les matières pectiques et les glycoprotéines sont excrétées à partir des vésicules dictyosomales par des processus d'exocytose, transportées dans des vésicules golgiennes jusqu'au plasmalemme auquel elles

s'incorporent pour participer à la formation des parois (PICKETT - HEAPS et NORTHCOTE, 1966; ROLAND et VIAN, 1970; RAMESY et BERLIN, 1976); la biosynthèse de la cellulose ne s'effectuant qu'au niveau du plasmalemme (CHRISPEELS, 1976 et RYSER, 1979).

Au moment de la synthèse des parois primaire et secondaire des fibres, on remarque une activité intense des dictyosomes qui fournissent de nombreuses vésicules golgiennes, fortement marquées après l'application de la méthode de THIERY.

WESTAFER et BROWN (1976) ont dénombré environ 75000 dictyosomes dans une fibre de coton de 2 cm de longueur et de 800 Å de diamètre, âgée de 30 à 35 jours.

Pour PILET (1971), les vésicules dictyosomales seraient d'abord des réservoirs de précurseurs de polysaccharides; elles joueraient ensuite le rôle de transporteur, en direction des parois, de composés de base qui pourraient, au cours de la migration des vésicules où ils sont enfermés, se polymériser progressivement.

Pour VAN DER WOUDE *et al.* (1974), les membranes de l'appareil de Golgi transporteraient jusqu'au plasmalemme la β 1,4 glucane synthétase nécessaire à la formation de la cellulose.

Rôle du plasmalemme.

Le plasmalemme présente un contour sinueux au moment de la mise en place de la paroi secondaire des fibres de *Gossypium barbadense* L. 28 jours après l'anthèse, des micro-invaginations du plasmalemme forment des microvésicules, fortement chargées de polysaccharides, au contact immédiat de la paroi secondaire en formation.

Le plasmalemme joue un rôle primordial dans le passage des précurseurs membranaires dans la paroi cellulaire par des phénomènes d'exocytose CRONSHAW (1965, 1967), ESAU *et al.* (1966), PICKETT - HEAPS et NORTHCOTE (1966), MUHLETHALER (1967), CZANISKI (1970) et ITOH (1974).

Pour BROWN et MONTEZINOS (1976), les membranes des micro-invaginations contiennent une glucane synthétase et seraient les sites de synthèse de microfibrilles cellulotiques.

ROBARDS et KIDWAI (1969) observent une activité enzymatique du plasmalemme en relation avec le dépôt des substances membranaires. Le plasmalemme contrôle la pénétration et la sortie des substances dissoutes, c'est-à-dire la perméabilité cellulaire. Il est le support de l'adénosine triphosphatase (ATPase) qui libère l'énergie nécessaire aux transports des ions à travers la membrane et aux processus de pinocytose (NOUGAREDE, 1969).

Comparaison avec *Gossypium hirsutum*.

L'élongation des fibres est acquise 20 jours après l'anthèse chez *G. hirsutum* L. (ITOH, 1974), 32 jours chez *G. barbadense* L.

La synthèse de la paroi primaire s'effectue jusqu'au 16^e jour chez les deux espèces (RYSER *et al.*, 1983); celle de la paroi secondaire débute 19 jours après l'anthèse chez *G. hirsutum* L., soit plus tardivement que chez *G. barbadense* L. (16^e jour). En outre, à maturité, la paroi secondaire des fibres du *G. barbadense* L. possède 30 couches cellulotiques alors que celle du *G. hirsutum* L. n'en renferme que 25 (RYSER *et al.*, 1983).

Notons que nos observations ne doivent pas être généralisées, n'ayant été effectuées que sur la variété GIZA 75. Elles mériteraient d'être étendues à d'autres variétés.

Conclusions

Nos résultats montrent que le développement des fibres de *Gossypium barbadense* L. passe par trois étapes successives: formation de la paroi primaire, mise en place et épaississement, puis maturation de la paroi secondaire.

La construction de la paroi secondaire, essentiellement marquée par le dépôt de couches cellulotiques successives, commence le 16^e jour après l'anthèse, alors que les fibres n'ont pas encore atteint leur longueur définitive. Un réseau extrêmement lâche de fines fibrilles cellulotiques constitue la première couche de la paroi secondaire. L'épaississement de la paroi secondaire s'effectue par des dépôts successifs de couches concentriques de microfibrilles cellulotiques. Trente couches cellulotiques se déposent parallèlement à l'axe longitudinal de la fibre, en 30 jours.

Il existe une relation directe entre l'âge et le nombre des couches cellulotiques de la paroi secondaire. 60 jours après l'anthèse, les fibres ont atteint leur complète maturité.

Les espaces entre les couches cellulotiques donnent à la fibre sa flexibilité et permettent la pénétration des colorants, tandis que le parallélisme des fibrilles est responsable de sa grande tenacité.

L'élongation des fibres est acquise plus tardivement chez *G. barbadense* que chez *G. hirsutum*. En outre, à maturité, la paroi secondaire des fibres de *G. barbadense* possède 30 couches cellulotiques alors que celle de *G. hirsutum* n'en renferme que 25. L'épaisseur plus grande de la paroi joue un rôle important dans la qualité technologique des fibres. Ces observations, effectuées sur une seule variété, ne doivent cependant pas être généralisées à l'espèce.

A l'appui des données bibliographiques, nous proposons un modèle pour rendre compte des modifications cytoplasmiques et membranaires associées à la mise en place des parois, primaire et secondaire, des fibres du cotonnier.

Les dictyosomes et les vésicules golgiennes jouent un rôle essentiel dans la formation de la paroi primaire. Au cours de l'épaississement de la paroi secondaire, trois types de vésicules sont observés : de petites vésicules au contenu dense, associées au plasmalemme ou au contact de la paroi primaire ; d'autres, plus volumineuses et enfin des vésicules de transport situées à proximité des saccules dictyosomaux.

Toutes ces vésicules sont fortement marquées après application de la méthode de THIERY. Leur étroite asso-

ciation avec la paroi montre qu'elles participent activement à son édification. Le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le plasmalemme jouent un rôle très important dans la formation des microvésicules qui contiennent les enzymes et les polysaccharides nécessaires à la synthèse des parois, primaire et secondaire. Par le jeu de phénomènes d'endocytose et d'exocytose, qui s'effectuent au niveau du plasmalemme et du réticulum endoplasmique, des micro-invaginations et des microvésicules transportent le matériel polysaccharidique nécessaire à l'épaississement de la paroi secondaire.

Références bibliographiques

- ALBERSHEIM P., 1965. — Plant Biochemistry. BONNER J. and VANER J.E., Academic Press ed., New York, London.
- ANDERSON D.B. and KERR T., 1938. — Growth and structure of cotton fibre. *Ind. Eng. Chem.*, 30, 48-54.
- BALLS W.L., 1915. — The development and properties of raw cotton. *A. and C. Black Ltd. London*, 73-85.
- BALLS W.L., 1928. — Studies of quality in cotton. *Macmillan and al. Ltd., London*, 16-25.
- BENNETT T.A., 1956 ; in : GENEVES L., 1979. — Biologie cellulaire, tome I : la cellule, microbiologie. *Bordas, Paris*, 105-113.
- BOURELY J., 1978. — Ontogénie des fibres textiles de l'*Hibiscus cannabinus* L. (Malvacées). *Thèse Doc. d'Etat, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI*, 89p.
- BROWN R.M., FRANKE W.W., KLEING H. and SITTE P., 1969. — A cellulosic wall component produced by the Golgi apparatus. *Science*, 166, 894-896.
- BROWN R.M., FRANKE W.W., KLEING H., FALK H. and SITTE P., 1970. Scale formation in chrysophycean algae : 1-cellulosic and non-cellulosic wall components made by the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.*, 45, 246-271.
- BROWN R.M., HERTH W. and ROMANOVICZ D., 1973. — The role of the Golgi apparatus in the biogenesis and secretion of a cellulosic glycoprotein in pleurochrysis : a model system for the synthesis of structural polysaccharides. In Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *Lewin F. ed., Academic Press, New York*, 207-258.
- BROWN R.M. and MONTEZINOS D.L., 1976. — Cellulose microfibrils : visualization of the biosynthesis and orienting complexes in the plasma membrane. *Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 73, 143-147.
- CHRISPEELS M.J., 1976. — Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27, 19-38.
- CRONSHAW J., 1965. — The organization of cytoplasmic components during the phase of cell wall thickening in differentiating cambial derivatives of *Acer rubrum*. *Can. J. Bot.*, 43, 1401-1407.
- CRONSHAW J., 1967. — Tracheid differentiation in tobacco pith cultures. *Planta*, 72, 78-90.
- CZANISKI Y., 1970. — Etude cytologique de la différenciation cellulaire du bois du robinier. II - Différenciation des cellules du parenchyme, cellules à réserves et cellules associées aux vaisseaux. *J. Microsc.*, 9, 389-406.
- ESAU K., CHEADLE V.E. and GILE R.H., 1966. — Cytology of differentiating tracheary elements. II. Structures associated with cell surfaces. *Amer. J. Bot.*, 53.
- FRANKE W.W., 1970. — Central dilations in maturing Golgi cisternae : A common structural feature among plant cells ? *Planta*, 90, 370-373.
- HERTH W., FRANKE W.W., STADLER J., BITTIGER H., KEILICH G. and BROWN M., 1972. — Further characterization of the alkali-stable material from the scales of *Pleurochrysis scherfflii* a cellulosic glycoprotein. *Planta*, 105, 79-92.
- ITOHT., 1974. — Fine structure and formation of cell wall of developing cotton fiber. *Wood Res.*, 56, 49-61.
- KASSENBECK P., 1961. — Etude au microscope électronique de la croissance des fibres de coton, variété Allen. *Cot. Fib. Trop.*, 16, 1-30.
- MOLLENHAUER H.H., WHALEY W.E. and LEECH J.H., 1961. — A function on the Golgi apparatus in outer root cap cells. *J. Ultrastructure Res.*, 5, 193-200.
- MUHLETHALER K., 1967. — Ultrastructure and formation of plant cell walls. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18, 1-24.

- M.G. Taha et J. Bourelly
- NOUGAREDE A., 1969. — Biologie végétale. I-Cytologie. Masson éd., Paris.
- PICKETT-HEAPS J.D. and NORTHCOTE D.H., 1966. — Relationship of cellular organelles to formation and development of the plant cell wall. *J. Exp. Bot.*, 17, 20-26.
- PILET P.E., 1971. — Les parois cellulaires. Doin éd., Paris.
- PIZZOLATO T.D. and HEIMSCH C., 1975. — Ontogeny of the protophloem fibres and secondary xylem fibres within the stem of *Coleus*. II—An electronic microscopy study. *Can. J. Bot.*, 53, 1672-1697.
- RAMSEY J.C. and BERLIN J.D., 1976. — Ultrastructural aspects of early stages in cotton fibre elongation. *Amer. J. Bot.*, 63, 868-876.
- ROBARDS A.W. and KIDWAI P., 1969. — Cytochemical localization of phosphatase in differentiating secondary vascular cells. *Planta*, 87, 227-238.
- ROLAND J.C., 1967. — Aspects infrastructuraux des relations existant entre le protoplasme et la paroi des cellules du collenchyme. *J. Microsc.*, 6, 399-412.
- ROLAND J.C. et VIAN B., 1970. — Précisions sur la localisation et les caractères ultrastructuraux de polysaccharides acides dans les cellules végétales. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 271, 572-575.
- ROLAND J.C. et PILET P.E., 1974. — Implication du plasmalemme et de la paroi dans la croissance des cellules végétales. *Experientia*, 30, 441-451.
- ROLLINS M.L., 1968. — Cell wall structure and cellulose synthesis. *For. Prod. J.*, 18, 2, 91-100.
- Cot. Fib. Trop., 1989, vol. XLIV, fasc. 2 — 109
- RYSER U., 1977. — Cell wall growth in elongating cotton fibres an autoradiographic study. *Cytobiologie*, 15, 78-84.
- RYSER U., 1979. — Cotton fibre differentiation : occurrence and distribution of coated and smooth vesicles during primary and secondary wall formation. *Protoplasma*, 98, 223-239.
- RYSER U., 1985. — Cell wall biosynthesis in differentiating cotton fibers. *European J. Cell Biology*, 39, 236-256.
- SCHUBERT A.M., BENEDICT C.R., BERLIN J.D. and KOHEL R.J., 1973. — Cotton fibre development kinetics of cell elongation and secondary wall thickening. *Crop Science*, 13, 704-709.
- SPURR A.R., 1969. — A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.*, 26, 31-43.
- SRIVASTAVA L.M. and O'BRIEN T.P., 1966. On the ultrastructure of cambium of *Pinus strobus* L. *Protoplasma*, 61, 257-276.
- THIERY J.P., 1967. — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.*, 6, 987-1018.
- VAN DER WOUDE W.J., IEMBI C.A., MORR D.J., RINDINGER J.L. and ORDIN L., 1974. — β -glucan synthetase of plasma membrane and Golgi apparatus from anion stem. *Plant Physiol.*, 54, 333-340.
- WESTAFER J.M. and BROWN R.M. Jr., 1976. — Electron microscopy of the cotton fibre. New observations on cell wall formation. *Cytobios*, 15, 111-138.

Electron microscopy of the formation of fibre walls in *Gossypium barbadense* L. in Egypt ¹

M.G. Taha and J. Bourelly

Summary

Formation of the primary and secondary walls of fibre of GIZA 75 variety *Gossypium barbadense* L. was examined using transmission and scanning electron microscopy from anthesis to full fibre maturity. The results show that like those of *G. hirsutum* L., the fibres of *G. barbadense* L. display three successive development stages: primary wall formation, growth and thickening and then maturation of the secondary wall. The initiation of the secondary wall, which is essentially marked by the deposit of

successive cellulose layers, starts on the 16th day after anthesis when the fibres have not yet reached full length. Thickening occurs over a 30-day period during which 30 successive layers of cellulose are deposited in parallel with the longitudinal axis of the fibres. A model is proposed for the description of the cytoplasmic and membrane modifications which occur during polysaccharide synthesis and the formation of fibre walls in cotton plants.

KEY WORDS: *Gossypium barbadense*, walls, fibre, microscopy, cellulose.

(1) This work is the fifth part of a State Doctorate thesis defended on 19th December 1986 at Université des Sciences et Techniques du Languedoc by M. G. Taha and prepared at the Textile Plant Chemistry Laboratory at Institut de Recherches du Coton et des Textiles Exotiques (IRCT-CIRAD), Montpellier.

Introduction

Cultivated almost only in Egypt and the Sudan, *Gossypium barbadense* L. gives extra-long and long fibres with exceptional fineness and strength. Egypt is the sixth world producer with regard to harvest quantity. It is in third position for fibre yield per hectare and is world leader for fibre quality. Other producing countries grow mainly *Gossypium hirsutum* L. whose fibres do not have such good technological characteristics. It was therefore interesting to find out whether these differences in quality were the result of modifications in fibre differentiation and evolution of the physicochemical constitution of fibre walls.

Microscopy of fibres during formation should enable better comprehension of most of their technological characteristics such as length, tenacity, fineness and elongation. The work was aimed at both obtaining better knowledge of the ontogeny of the textile fibres of *G. barbadense* in comparison with *G. hirsutum* and improving understanding of the formation and evolution of fibres during maturation with a view to meeting cotton production requirements, i.e. increasing yields of the best quality fibres.

Material and methods

Transmission electron microscopy

The Egyptian variety of *Gossypium barbadense* L. GIZA 75 was cultivated at Bahim, Egypt, at the Cotton Research Institute experimental station. Flowers were labelled on the day of anthesis. Bolls were harvested at different stages of development starting on the 8th day after anthesis until complete maturity of the fibres (60 days after anthesis). Fibres and young seeds from each boll ("seed cotton") were separated by means of a scalpel and a tweezer and conserved immediately in ethyl alcohol 95%. Fibre fragments several millimetres long were fixed by a 4% solution of glutaraldehyde buffered to pH 7.5 by a 0.1M sodium cacodylate solution.

After two hours of fixation at laboratory temperature followed by three 1-hour washings in the same buffer, the samples were post-fixed for 1 hour in a 1% aqueous osmium tetroxide solution (pH 7.4).

The fragments were washed several times with distilled water and then dehydrated by successive immersion in increasing concentrations of ethanol (25°, 50°, 70°, 85° and 95° GL) followed by washing three times for 1 hour in absolute alcohol.

After 30 min in a mixture of equal volumes of absolute ethyl alcohol and propylene oxide, the samples were immersed in three successive baths of pure propylene oxide for 30 min. They were then embedded in resin (SPURR, 1969).

Ultra-fine sections carried out using a REICHERT OMU3 ultramicrotome with a DIATOME diamond blade

Most of the technological qualities of cotton fibres depend on the length, thickness and physicochemical make-up of their walls. It is necessary to know their composition and how they form. Fibres develop during a specific period with successive stages of growth. Bounded by flowering and boll opening, fibre evolution begins with intense apical and sub-apical growth which multiplies the initial length by 2,000 to 3,000 (RYSER, 1977). It is commonly agreed that fibre is unicellular and that it develops from a cell on the epidermis of the ovule. This was established by BALLS (1915 and 1928) in Egyptian cotton and by ANDERSON and KERR (1938) and by SCHUBERT *et al.* (1973) in American cotton.

The walls of mature fibres consist mainly of microfibrils which contain over 95% cellulose. Little is known about the process by which walls form and microfibrils become organized in the walls. It was therefore decided to examine the cell transformations which lead to synthesis of primary and secondary walls in fibres of *Gossypium barbadense* L. under their conditions of development in Egypt.

were collected on gold grid. Thiery's thiocarbonyldrazide-silver proteinate method (1967) was used to reveal membrane polysaccharides. The sections were examined using a JEOL-JEM 200 transmission electron microscope.

Scanning electron microscopy

The samples were fixed, post-fixed and dehydrated by increasing concentrations of ethanol as described above. During treatment with absolute ethanol, some of the samples were treated using the critical point technique in liquid CO₂. The material was then metallized under vacuum with pure gold. The sections were examined using a scanning electron microscope.

Micrograph processing using an image analyser

The micrographs made during microscopic examination were observed directly using a CCD FAIRCHILD camera connected to a processing system consisting of a central processing unit (DATA SUD system) and peripherals (Figure 1). An input board was used to record the images from the camera. It was connected to three storage planes for image storage and analysis.

A CPU board and a 256 Kb memory card managed the system. A colour board made it possible to colour shades of grey, which increased processing possibilities. Direct or imported images were observed on a black and white monitor and imported colour images observed on a colour monitor. A terminal with a keyboard and a monitor was used to load programs and examine the results, which could be printed out.

Image analysis then consisted of form or object identification with either counting of numbers or characterization of various parameters (area, boundary, diameter, centre of gravity, form factor).

One of the advantages of the image analyser was that it could attribute to each level of grey a different colour from

a palette obtained by mixing the three primary colours blue, yellow and red. Each colour could take one of 256 shades of grey. These 256 shades of grey could thus be identified by a different colour, enabling the differentiation of the parts to be studied from their surroundings. Image processing of micrographs gave good contrasts for organelles containing silver salts after use of Thiery's method.

Results

Cytoplasm and membrane changes in fibres during formation of the primary wall

Fibres consist of ovule epiderm cells produced on the day of anthesis. An 8-day-old fibre possesses a primary wall 0.13 μm thick (Figure 2, pp). Numerous dictyosomes (d) close to the primary wall (pp) are formed by the stacking of 5 to 7 flattened saccules (s) with thicker edges at the level of which small vesicles (vg) extend into the cytoplasm. Three types of vesicle can be observed: 1) small vesicles (vg and arrows) associated with the plasmalemma or in contact with the primary wall (pp) have dense contents; 2) more bulky vesicles 100 to 600 \AA in diameter (vg and double arrows) that appear to be derived from the coalescence of smaller elements and which are marked in particular around the edges; 3) a third type (ve) derived from dictyosomal saccules (d and white arrow) are transport vesicles from the endoplasmic reticulum transition zone (rer). The latter contain secretion reserves of the same type as those concerned in synthesis of the primary wall (pp). The smooth endoplasmic reticulum (res) is developed in particular near the primary wall.

An ultra-fine cross-section of a 12-day-old fibre shows the presence of polysaccharide materials in the vesicles formed by dictyosomal saccules (Figure 3, vg and arrows). These substances are similar to those found in the primary wall (Figure 3, pp and arrows).

Primary wall thickness had increased to 0.22 μm . Rough endoplasmic reticulum forms a system of intracytoplasmic cavities with ribosomes on the outer surface (Figure 3, rer). The smooth form is next to the plasmalemma (res, pl and thin arrows). Vesicles associated with dictyosomes (vg and arrows) and with plasmalemma (vg, pl and double arrows) can be seen. All these vesicles were strongly marked after use of Thiery's method.

The similar appearance firstly of the contents of dictyosomes (d), Golgi vesicles (vg) and plasmalemma (pl) and secondly of the substances forming the primary wall (Figure 3, pp and thick arrows) can be seen. All these organelles, which contain polysaccharides, contribute to synthesis of the primary wall. The nucleus (Figure 4, N) contains condensed chromatin (chr) zones in which DNA is concentrated. A multivesicular body (emv) can be seen on the right of Figure 4: its external membrane is dissociated (emv and double arrows). It contains small vesicles (ve) strongly marked by Thiery's method. The borders of large vesicles (ve and white arrows) are marked. A mitochondrion can also be seen (Fig. 4, m). A dictyosome (d) has put out numerous vesicles (vg) loaded with polysaccharides. The plasmalemma is locally discontinuous and indented in sinuous profiles (Figure 4, pl and thin arrows).

Examination at high magnification of a fibre 12 days after anthesis revealed microtubules widely distributed and lying parallel to the longitudinal axis of the cell (Figure 5, mt).

Figure 6 shows a cross-section of a 12-day-old fibre. Vesicles (vg and thin arrows) loaded with polysaccharides are free in the cytoplasm or associated with plasmalemma (pl and thick arrows). Some are in contact with and integrated in the primary wall (pp and double arrows). The similarity of vesicle contents and their close association with the wall show that they make an active contribution to the construction of the primary wall (pp).

Events connected with the establishment and thickening of the secondary wall

The establishment of the secondary wall, marked essentially by the deposit of successive layers of cellulose, began after synthesis of the primary wall and before fibre had reached its final length.

Figure 7 shows the start of the establishment of the secondary wall (ps and thin arrows) in a fibre 16 days after anthesis. Secondary wall (ps) forms an extremely loose network of fine cellulose fibrils (fi and thin arrows) in contact with the primary wall (pp). Mitochondria (m) and numerous vesicles (vg) loaded with polysaccharides can be observed. Microvesicles (mv and thick arrows) are incorporated in plasmalemma (pl). Application of Thiery's method after treatment for 5 hours of a cross-section of 20-day-old fibre with the periodic acid shows that fibrils are deposited with regular spacing in parallel with the longitudinal axis (Figure 8, fi). At this stage, there are 4 to 5 layers of cellulose (fi), representing the number of days of increase in thickness. Each layer is formed of about a hundred fibrils 0.4 μm thick.

Intense dictyosomal activity was observed with the formation of numerous small vesicles with dense contents (vg) and others which were only contrasted around the edges (ve and thick arrows). Golgi apparatus saccules form swellings (white arrows) which give rise to another type of vesicle (vs) heavily loaded with silver salts.

Microvesicles (mv and thin arrows) containing polysaccharides are integrated in the plasmalemma (pl). A mitochondrion can be seen (Figure 8, m) and ribosomes (r) in groups of 4 to 10 in spiral polysomes (double arrows) near the endoplasmic reticulum (rer).

The secondary wall continues to thicken by successive cellulose deposits. A cross-section of a 24-day-old fibre

treated with periodic acid for 5 hours and then with Thiery's method shows that the secondary wall (ps) consisted of 8 concentric cellulose layers (fi) corresponding to the number of days since the establishment of the secondary wall. The endoplasmic reticulum (Figure 9, rer) produced microvesicles (mv) associated with the plasmalemma (pl and arrows) and with a high polysaccharides content. Three types of vesicle are sited near the dictyosomes. The first type (ve) is free in the cytoplasm and other, large ones (vg and thick arrows) are only marked around their edges. The last type is associated with the plasmalemma and has dense electron-opaque contents (Figure 9, pl and vg).

A cross-section of a 28-day-old fibre (Figure 10) shows that the secondary wall (ps) consists of 11 to 12 cellulose layers (fi). At this stage, the endoplasmic reticulum (rer) produces numerous microvesicles at immediate contact with the plasmalemma (Figure 10, mv and arrows) and into which these were incorporated. Dictyosomes (d) still produced numerous vesicles (vg) of all sizes and strongly loaded with polysaccharides. Finally, other vesicles, which appear to have crossed the plasmalemma (white arrows) are in direct contact with the last layer of secondary wall in course of formation.

The plasmalemma of a 28-day-old fibre (Figure 11, pl) is very sinuous. Invaginations (i) 300 to 500 Å in diameter are incorporated in the plasmalemma by endocytosis. These invaginations in turn cause the formation of various vesicles (Figures 11, 12, v) which are strongly marked by Thiery's method. The observations show that these organelles are involved in synthesis of cellulose in the secondary wall (BROWN and MONTEZINOS, 1976).

Figure 13 shows a cross-section of a 40-day-old fibre after application of Thiery's method and a study using image analysis. The secondary wall (ps) formed by 24 concentric layers of cellulose fibrils (fi) had continued to thicken. Near the plasmalemma (pl), a network of fine fibrils (fi and thin arrows) indicates the deposition of the last cellulose layer of the secondary wall. Microvesicles (mg and mv) strongly loaded with silver salts are found against the plasmalemma and also at fibril level.

In immediate contact with the plasmalemma (pl), vesicles (vg) and a multivesicular body (cmv) contain polysaccharides. A dictyosome (d), formed small vesicles (double arrows) and other more bulky ones marked around their edges (vg and thick arrow).

The cellulose layers forming the secondary wall (ps) in a 60-day-old fibre (Figure 14) are now thicker. Anastomosis is frequent between two consecutive rings (fi and thick arrows). 30 cellulose layers representing the number of days of growth in thickness of the secondary wall can be seen. Near the plasmalemma (pl), swelling of a dictyosomal saccule (Figure 14, white arrow) forms secretory vesicles (vs) which fuse with the plasmalemma.

Microscopy of fibres of different ages

Scanning electron microscopy was used to examine fibres at different stages of differentiation. Eight days after anthesis (Figure 15), a young fibre forms a long, flattened tube; it is twisted alternately towards right and left with frequent reversal of the direction of rotation (arrows). At this stage, the fibre consists only of a thin pectocellulose wall, the outside of which is covered by a thin waxy layer (KASSENBECK, 1961; ROLLINS, 1968). Direction of twisting faithfully follows the longitudinal spiral orientation of the primary wall microfibrils (Figure 15, arrows).

The secondary wall began to develop 16 days after anthesis (Figure 16). The successive cellulose layers thicken and consolidate the wall and the flattened, twisted, ribbon-like fibres are less numerous than before. The cellulose fibrils form a helicoid network (thin arrows).

Figure 17 shows 40-day-old fibres. They do not yet have their final cylindrical shape. The splitting of certain cells into elementary subunits can be seen in places (white arrows). Cellulose fibrils lie parallel to the longitudinal axis (double arrows).

Fibres were fully mature 60 days after anthesis (Figure 18). No cell flattening can be seen. All the fibres have a regular, cylindrical shape resulting from the considerable thickening of the cellulose secondary wall which forms most of the cell volume.

Discussion

Model proposed to account for cytoplasm and membrane changes connected with the formation of fibre walls

Our observations using electron microscopy showed that fibre development in *Gossypium barbadense* L. is in three successive stages: formation of the primary wall, establishment of the secondary wall, and then thickening of cellulose and maturation.

With the help of bibliographical data, we propose a

model to describe ultrastructural changes in cytoplasm and membranes which take place during synthesis of polysaccharides and the formation of the primary and secondary walls of fibres of *Gossypium barbadense* L.

Our observations are summarized in Figure 19.

1 - Synthetases form in the endoplasmic reticulum (rer and res) during synthesis of the primary wall (SRIVASTAVA and O'BRIEN, 1966; ROLAND, 1967).

2 - These enzymes are translocated from the reticulum to the Golgi apparatus (aG) in three different ways:

- by means of small transport vesicles (ve) which form at the endoplasmic reticulum transition zone;

- by fine contractions of reticular membranes which cause an increase in internal pressure and release of contents outside the reticulum (arrows);

- by flow of the contents of locally dissociated reticulum (BENNET, 1956).

Membrane precursors are synthesized in dictyosome saccules under the effect of enzymes from the reticulum.

3 - Swellings (3, opposing arrows) form in dictyosomal saccules which incorporate these reserves (FRANKE, 1970).

4 - The swellings move towards the edges of the saccules and produce secretory vesicles (vs) (see also Figure 2, vs and white arrows).

5 - The secretory vesicles (vs) become detached from the saccules and move towards the plasmalemma (pl).

6 - The secretory vesicles frequently come into contact with the plasmalemma (pl) where endocytosis occurs (vs and double arrows). Their polysaccharide contents are re-released at primary wall level (dashes and pp).

7 - Golgi vesicles bud off the dictyosomes. Some are bulky (vg and double arrows) and only contrasted at the edge; others (vg and arrows), strongly loaded with polysaccharides, release their contents at primary wall level (vg, dashes, arrows and pp). They thus contribute to the thickening of the wall during the fibre elongation phase (BROWN and MONTEZINOS, 1976).

8 - At the start of synthesis of the secondary wall (ps), the membranes dissociated from the secretory (vs) and Golgi vesicles (vg) release the enzymes responsible for the polymerization of polysaccharides and the formation of cellulose microfibrils (fi). These membranes fuse with the plasmalemma where a cellulose synthetase at β 1,4 forms at places, together with polysaccharide membrane precursors including uridine diphosphate glucose and UDP-galactose (ROLAND and PILET, 1974; RYSER, 1985). These elements contribute to the synthesis of secondary wall cellulose microfibrils (fi).

9 - During thickening of the secondary wall, endoplasmic reticulum (rer) is frequently observed in contact with the plasmalemma (pl). The external reticular membrane is smooth in places because of the release of ribosomes which group to form spiral polysomes in the cytoplasm (thin arrows). The smooth parts of the reticular membrane dilate towards the outside (thick arrows) and form microvesicles (mv and double arrows) which become detached from the reticulum and come into contact with the plasmalemma (see also Figures 9 and 10). In turn, micro-invaginations (mi) form various microvesicles (mv) from the plasmalemma (pl) which translocate the cellulose synthetase required for the formation of the cellulose layers in the secondary wall (fi and ps).

Role of ultrastructural organelles in the building up of fibre walls in *Gossypium barbadense* L.

Role of endoplasmic reticulum

The vesicles derived from the endoplasmic reticulum play a very important role, through exocytosis through the plasmalemma, in the synthesis of secondary wall cellulose in *Gossypium barbadense* L. fibres. This results in an increase in the cellulose content of the secondary wall with age. This was confirmed by chemical analysis of the fibres which showed that the cellulose content increases progressively from the 16th day after anthesis (25%) until fibre maturity (94%).

CRONSHAW (1965) noted the presence of vesicles from the endoplasmic reticulum during cellulose thickening of the secondary wall of *Acer rubrum* xylem. The endoplasmic reticulum in protophloem cells of *Coleus* stem which develop into fibres is branched and often tubular and edged with ribosomes; it forms numerous vesicles which contribute to the formation of the secondary wall (PIZZOLATO and HEIMSCH, 1975). The endoplasmic reticulum of *Gossypium hirsutum* L. is extremely well developed and makes microvesicles during thickening of the secondary wall (WESTAFER and BROWN, 1976).

Role of the Golgi apparatus

The role of the Golgi apparatus in wall formation and cellulose synthesis was mentioned by MOLLENHAUER *et al.* (1961), ALBERSHEIM (1965), BROWN *et al.* (1969, 1970, 1970, 1973), HERTH *et al.* (1972), ROLAND and PILET (1974) and PIZZOLATO and HEIMSCH (1975). Hemicellulose, pectic substances and glycoproteins are excreted by dictyosomal vesicles by exocytosis, translocated in Golgi vesicles to the plasmalemma into which they fuse to contribute to the formation of the walls (PICKETT-HEAPS and NORTHCOTE, 1966; ROLAND and VIAN, 1970; RAMESY and BERLIN, 1976). Biosynthesis of cellulose takes place only at plasmalemma level (CHRISPEELS, 1976; RYSER, 1979).

Intense dictyosome activity was noted during synthesis of the primary and secondary fibre walls, with the formation of numerous Golgi vesicles which were strongly marked by Thiery's method. WESTAFER and BROWN (1976) counted approximately 75,000 dictyosomes in a 2 cm length of cotton fibre 800 Å in diameter, 30-35 days old.

PILET (1971) considered that dictyosomal vesicles were probably reservoirs of polysaccharide precursors. They would subsequently transport to the walls basic compounds which would polymerize progressively during the translocation of the vesicles containing them. VAN DER WOUDE *et al.* (1974) considered that Golgi apparatus membranes probably carried to the plasmalemma the β 1,4 glucan synthetase required for cellulose formation.

Role of plasmalemma

The plasmalemma displays a sinuous profile during formation of the secondary wall of *Gossypium barbadense* L. Twenty-eight days after anthesis, plasmalemma micro-invasions form - in immediate contact with the secondary wall in course of formation - microvesicles that are strongly loaded with polysaccharides. Plasmalemma plays a leading role in the translocation of membrane precursors to the cell wall by means of exocytosis (CRONSHAW, 1965, 1967; ESAU *et al.*, 1966; PICKETT-HEAPS and NORTHCOTE, 1966; MUHLETHALER, 1967; CZARNISKI, 1970; ITOH, 1974).

BROWN and MONTEZINOS (1976) were of the opinion that the membranes of micro-invasions contained a glucan synthetase and were probably sites of the synthesis of cellulose microfibrils. ROBARDS and KIDWAI (1969) observed enzymatic activity in plasmalemma related to the deposit of membrane substances. The plasmalemma controls penetration and release of dissolved

substances, i.e. cell permeability. It forms the support for adenosine triphosphatase (ATPase) which releases the energy required for the translocation of ions through the membrane and for pinocytosis (NOUGAREDE, 1969).

Comparison with *Gossypium hirsutum*

Fibre elongation took place 20 days after anthesis in *G. hirsutum* L. (ITOH, 1974) and 32 days after anthesis in *G. barbadense* L. Synthesis of the primary wall takes place until the 16th day in both species (RYSER *et al.*, 1983); that of the secondary wall begins 19 days after anthesis in *G. hirsutum* L., which is later than in *G. barbadense* L. (16th day). In addition, at maturity the secondary wall of *G. barbadense* L. fibres possesses 30 layers of cellulose and that of *G. hirsutum* L. has only 25 (RYSER *et al.*, 1983).

It is noted that our observations should not be generalized since they were only carried out on the GIZA 75 variety. They should be extended to other varieties.

Conclusions

Our results show that the fibres of *Gossypium barbadense* L. display three successive stages of development: formation of the primary wall, establishment and thickening of the secondary wall and then maturation of the latter.

Formation of the secondary wall, which is essentially marked by the deposit of successive layers of cellulose, begins on the 16th day after anthesis when the fibres have not reached their final length. An extremely loose network of fine cellulose fibrils forms the first layer of the secondary wall. Thickening of the secondary wall takes place by successive deposit of concentric layers of cellulose microfibrils. In 30 days, 30 layers of cellulose layers are laid down parallel to the longitudinal axis of the fibre. There is a direct connection between age of the fibre and the number of cellulose layers of the secondary wall. Full fibre maturity is reached 60 days after anthesis.

The spaces between cellulose layers give fibre its flexibility and enable penetration by dyes whereas the parallel layout of fibrils is responsible for high tenacity.

Elongation of fibres is complete later in *G. barbadense* than in *G. hirsutum*. In addition, the secondary wall of mature *G. barbadense* fibres possesses 30 cellulose layers whereas that of *G. hirsutum* has only 25. The greater wall

thickness plays an important role in the technological quality of the fibres. However, these observations for a single variety should not be extended to cover the whole species.

With backing from bibliographical data, we propose a model to account for the cytoplasm and membrane changes associated with the formation of the primary and secondary walls of cotton fibres. Dictyosomes and Golgi vesicles play an essential role in the formation of the primary wall. Three types of vesicle can be observed during thickening of the secondary wall: small vesicles with dense contents and associated with the plasmalemma or in contact with the primary wall, other more voluminous vesicles and finally transport vesicles located near dictyosomal saccules. All these vesicles were strongly marked by Thiery's method. Their close relations with the wall shows that they make an active contribution to its formation. The endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and the plasmalemma play a very important role in the formation of microvesicles which contain enzymes and the polysaccharide materials required for synthesis of primary and secondary walls. Through endocytosis and exocytosis at plasmalemma and endoplasmic reticulum levels, micro-invasions and microvesicles transport the polysaccharide substances required for the thickening of the secondary wall.

Microscopía electrónica de la formación de las paredes de las fibras de *Gossypium barbadense* L. en Egipto

M.G. Taha y J. Bourély

Resumen

Hemos examinado la formación de las paredes, primaria y secundaria, de las fibras de la variedad GIZA 75 de *Gossypium barbadense* L. con un microscopio electrónico de transmisión y de exploración, desde la antesis hasta la madurez completa de las fibras.

Este examen muestra que las fibras de *G. barbadense*, así como las de *G. hirsutum* L., se desarrollan en tres etapas: formación de la pared primaria, aparición y ensanchamiento, luego maduración de la pared secundaria.

La formación de la pared secundaria, caracterizada esencial-

mente por el depósito de capas sucesivas de celulosa, empieza el 16^º día después de la antesis, cuando las fibras no han alcanzado todavía su altura definitiva.

El crecimiento en espesor dura 50 días durante los cuales 30 capas sucesivas de celulosa se depositan paralelamente al eje longitudinal de las fibras.

El modelo propuesto muestra las modificaciones del citoplasma y de las membranas que intervienen en la síntesis de los polisacáridos y en la formación de las paredes del algodonero.

PALABRAS CLAVE : *Gossypium barbadense* L., paredes, fibras, microscopía, celulosa.